Aus der dermatologischen Universitätsklinik in Basel.
Vorsteher: Prof. Br. Bloch.

Untersuchungen über die Beeinflussung des Pigment bildenden Oxydationsfermentes (Dopaoxydase) der Meerschweinchenhaut durch physikalische und chemische Einwirkungen.

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der hohen medizinischen Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von

ADOLF WUHRMANN
med. pract.
aus Zürich.

Basel 1916
Buchdruckerei Emil Birkhäuser.

Aus der dermatologischen Universitätsklinik in Basel.
Vorsteher: Prof. Br. Bloch.

Untersuchungen über die Beeinflussung des Pigment bildenden Oxydationsfermentes (Dopaoxydase) der Meerschweinchenhaut durch physikalische und chemische Einwirkungen.

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der hohen medizinischen Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von

ADOLF WUHRMANN
med. pract.
aus Zürich.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

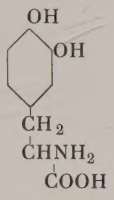
Basel 1916
Buchdruckerei Emil Birkhäuser.

Von der medizinischen Fakultät Basel
genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. **B. Bloch.**

Das Thema der vorliegenden Arbeit gilt der Untersuchung eines neu entdeckten, intrazellulären Oxydationsfermentes, der Dopaoxydase. Dieses Ferment ist von Bloch im Protoplasma der Epithelzellen der Basalschicht (teilweise auch des Stratum spinosum) des Follikeltrichters, der äussern Wurzelscheide, sowie der Haarmatrix gefunden worden, soweit diese Zellen die latente oder manifeste Fähigkeit der Pigmentproduktion besitzen. Der Nachweis des Fermentes wird auf folgende Weise erbracht:

Es wird dazu die *Dioxyphenylalanin(Dopa)methode* verwendet (Bloch). Das Reagens, Dioxyphenylalanin, ist die Verbindung von Brenzkatechin mit der α-Aminopropionsäure:



Und zwar dient in allen Versuchen als Reagens eine 1 promillige Lösung der Substanz in Wasser.

Um das Ferment nachzuweisen, werden dazu geeignete (am besten dunkelbraune) Meerschweinchen - Hautstücke exzidiert, in Agar eingebettet und mittelst des Gefriermikrotoms geschnitten. Die erhaltenen Schnitte werden dann für 24 Stunden in die 1 ‰ Dopalösung gebracht, sei es in Zimmer-, sei es in Brutschranktemperatur, nachher ausgewaschen, aufgezogen, in Alkohol entwässert, in Xylol geklärt und in Kanadabalsam eingebettet.

An den Stellen nun, wo das neue Ferment vorhanden ist, tritt die Reaktion auf, die sich äussert in einer Dunkelfärbung, die, bei hellgrau beginnend, alle Nüancen bis kohlschwarz annehmen kann.

Bloch hat bewiesen, dass die Dopaoxydase dasjenige Ferment ist, welchem im lebenden Organismus die Aufgabe zukommt, aus noch unbekannten, aber dem 3,4=Dioxyphenyl-

alanin zum mindesten sehr nahe stehenden, wenn nicht mit ihm identischen Pigmentvorstufen das ächte Hautmelanin zu bilden. Nur dort, wo dieses Ferment vorhanden ist, kann überhaupt Melanin produziert werden. Überall dort, wo Haumelanin gebildet wird, lässt sich dieses Ferment auch durch die oben angegebene Reaktion, die Dopareaktion nachweisen.

Die Dopaoxydase ist das zweite, bis jetzt bekannt gewordene, intrazelluläre Ferment, das sich direkt im Schnitt nachweisen lässt. Es unterscheidet sich aber von dem bisher bekannten Oxydationsferment, der sogenannten Phenolase (Polyphenoloxydase), dadurch, dass es viel spezifischer wirkt und dass seine physiologische Funktion, die Pigmentbildung, bereits feststeht.

Die Phenolase, die durch eine Reihe von Reaktionen, namentlich durch die sogenannte Indophenolblausynthese, nachgewiesen werden kann, ist von Spitzer und Röhmann im Organbrei entdeckt, dann aber besonders von Winkler, Löhle und F. H. Schultze studiert worden. Sie ist in den Granula der myelogenen Leukozyten, sowie in den Granula mancher Drüsenzellen (Speichel-, Schleim-, Tränendrüsen durch Schultze, Schweissdrüsen durch Bloch) gefunden worden. Zum Unterschied von der Dopaoxydase ist sie in chemischer Hinsicht nicht spezifisch, sondern vermag eine grosse Reihe von Polyphenolen und die ihnen entsprechenden Aminoverbindungen zu oxydieren. Über ihre Bedeutung unter physiologischen und pathologischen Verhältnissen wissen wir noch absolut nichts. Einige ihrer Eigenschaften sind von Schultze untersucht worden:

Er verwendet zu ihrem Nachweis drei einander ähnliche und aus der ersten Methode hervorgegangene Modifikationen, die hier zunächst der Vollständigkeit wegen kurz erwähnt seien.

1. Modifikation A.

I. Eine Lösung von 1,0 Alpha-Naphtol in 100 cm^3 Wasser wird bis zum Sieden erhitzt und dazu ca. 10 cm^9 Natronlauge zugesetzt.

II. 1,0 cm^3 der Dimethylparaphenylendiaminbase wird in 100 cm^3 destillierten Wassers gelöst.

Die Lösungen I und II werden zu gleichen Teilen gemischt, filtriert und in das Filtrat die Schnitte gebracht bis zur intensiven Blaufärbung (bei positiver Reaktion).

2. Modifikation B.

Lösung I besteht aus einer 2%igen Mikrocitinlösung, Lösung II aus einer 1% Dimethylparaphenylendiaminchlorhydratlösung. Das Vorgehen ist dasselbe. Es tritt eine Braunfärbung auf, während sich Fett im Gegensatz zu Modifikation A (violett) überhaupt nicht färbt.

3. Modifikation C.

Lösung I entspricht der Lösung I der Modifikation A. Lösung II besteht aus einer 1% wässerigen Lösung von Paranitrosodimethylanilin. Das Vorgehen ist gleich wie in A und B. Die Färbung ist grauschwarz. Über das Verhalten des Fettes gibt Schultze bei Modifikation C nichts an.

Was nun die Eigenschaften dieser Oxydase anbetrifft, so seien die wichtigsten Ergebnisse im folgenden kurz zusammengestellt.

Die Oxydasereaktion tritt nur in granulierten Zellen, in Leukozyten, Tränen- und Speicheldrüsen-Zellen auf. Gefärbt werden die Granula. Die Reaktion tritt gar nicht auf nach Vorbehandlung der Schnitte mit schwachen Säuren, freiem Cyan-Wasserstoff und nach Kochen. Geschädigt wird die Reaktion ferner durch vorhergehenden Aufenthalt der Schnitte in destilliertem Wasser, in absolutem und verdünntem Alkohol. Die Zeiten, die zur Hervorrufung der Schädigung nötig sind, wechseln stark, sind manchmal sehr kurz und manchmal sehr lang. Schultze schliesst aus der Granualfärbung, dass die Granula als Sauerstoffüberträger dienen und dass der Ort der Färbung zugleich der Aufenthaltsort der Oxydase, ist. Den Einwänden, dass es sich lediglich um eine Färbung von Fetten handle, tritt er gegenüber, indem er anführt, dass Fette sich bei Färbung nach Modifikation A mehr violettrot, bei Färbung nach Modifikation B überhaupt nicht färben, dass ferner die Farbe vom Fett durch Alkohol nicht ausgezogen werde, wohl aber die der Granula, endlich dass die Fettfärbung von Säuren nicht beeinflusst werde, sondern auch noch nach vorhergehender Behandlung der Schnitte mit Säuren auftrete, während eine Färbung der Granula bei gleichem Vorgehen ausbleibe, weil das Ferment eben zerstört sei.

Endlich stellt er fest, dass die Oxydase durch die Farbstoffbildung nicht verbraucht werde, denn wenn man die Farbe

jeweilen wieder mit Alkohol sorgfältig ausziehe, so trete sie dennoch bei erneutem Hinzufügen des Reagens immer wieder auf.

Dass es sich bei der Substanz um ein Oxydaseferment handelt, schliesst er aus ihrer Zerstörbarkeit durch Säuren, Alkohol und durch Kochen, und aus ihrer spezifischen Wirksamkeit. Da nur granulahaltige Zellen die Reaktion geben, schliesst er, dass nur die Granula das Ferment enthalten und dass die intensive Färbung der Granula einerseits auf einer besondern Affinität des Farbstoffs zu ihnen, anderseits auf der Sauerstoffübertragung der Substanz beruhe. Wo eine Affinität zwischen Granula und Farbstoff fehlt, tritt wohl die Reaktion auf, ist aber nur vorübergehend, d. h. es findet keine dauernde Färbung statt. Dass Granula und Ferment nicht identisch miteinander sind, schliesst Schultze daraus, dass die Granula, auch wenn die Reaktion infolge irgend einer zerstörenden Vorbehandlung ausbleibt, dennoch histologisch gut erhalten sind. Endlich kommt er zum Schlusse, dass das Ferment keine lipoide Beschaffenheit besitzen könne, da es durch dünnen Alkohol ausziehbar sei.

Über das eigentliche Wesen und die Konstitution der im lebenden Organismus gefundenen Fermente, sowohl der intrazellulären als auch der nach aussen (z. B. in den Darm als Pepsin und Trypsin) oder direkt in das Blut sezernierten Fermente wissen wir bekanntlich noch nichts Genaues. Wir erschliessen die Anwesenheit eines Fermentes aus der besondern Art der durch dasselbe bewirkten Reaktionen. Diese Auffassung des Fermentes ist eine mehr oder weniger konventionelle.

Im übrigen sind wir beim Studium eines Fermentes lediglich darauf angewiesen, die Eigenschaften der Fermentreaktion zu erforschen, mit andern Worten festzustellen, bei welchen Versuchsbedingungen die Reaktion stattfindet und unter welchen Bedingungen sie ausbleibt. Eine voll befriedigende Erklärung des Wesens der Fermente werden wir durch diese Art der Untersuchung natürlich nie erhalten. Dies wird erst möglich sein, wenn es einmal gelungen sein wird, ein Ferment zu isolieren, seine Konstitution aufzuklären, resp. den Mechanismus festzustellen, durch welchen der Vorgang zustande kommt, den wir speziell im Gegensatz zur einfachen chemischen Umwandlung als fermentative Reaktion bezeichnen.

Solange aber diese rationelle Untersuchungsmethode noch nicht möglich ist, sind wir, wie schon bemerkt, darauf angewiesen, die Reaktion eines bestimmten Fermentes verschiedenen

willkürlich von uns gewählten Versuchsbedingungen zu unterwerfen und so die Eigenschaften des Fermentes näher zu umgrenzen. Über Versuche dieser Art in bezug auf die Dopaoxydase soll im folgenden berichtet werden.

I.

Allgemeine Versuchstechnik.

Um ein möglichst gleichmässiges Versuchsmaterial zu erhalten, wurden für die grösste Zahl der Versuche Meerschweinchen verwendet, die sowohl braune Haare als braunpigmentierte Haut hatten. Durch die Erfahrung in der Auswahl der Versuchstiere kam ich dazu, nur möglichst dunkelbraune Tiere zu verwenden, womöglich solche, die überhaupt keinen weissen, wohl aber irgendwo einen vereinzelten schwarzbehaarten Fleck hatten.

Das Vorgehen war dabei stets folgendes:

Aus den möglichst kurz vorher exzidierten Hautstücken, die in Agar eingebettet wurden, wurden dünne Gefrierschnitte hergestellt. Die Gefrierschnitte wurden in Schälchen (Blockschälchen) mit 1 ‰, wässeriger Lösung von Dioxyphenylalanin (Dopa-) übergossen, das von Prof. Bloch auf synthetischem Wege hergestellt worden, also optisch inaktiv war, im Gegensatz zu dem natürlich (in Vicia faba) vorkommenden, das die Ebene des polarisierten Lichtes nach links dreht (Guggenheim). Die Schälchen nun stellten wir gedeckt, um sie vor Verdunstung zu schützen, für 24 Stunden teils in Brutschrank-, teils in Zimmertemperatur auf. Das Verfahren mit zwei verschiedenen Temperaturen wurde angewandt, da gewöhnlich die Schnitte in Zimmertemperatur besser zu beurteilen waren, in manchen Fällen aber, so namentlich bei stark abgeschwächter Reaktion den stärker reagierenden Brutschrankpräparaten der Vorzug gegeben werden musste. Nach 24 Stunden wurden die Schnitte aus der Dopalösung in destilliertes Wasser gebracht, abgespült, auf Objektträger aufgezogen, in Alkohol entwässert, durch Xylol aufgehellt und in Kanadabalsam eingebettet. Zum Vergleiche wurden stets auch einzelne Schnitte, ohne vorher in Dopalösung gelegen zu haben, als Nativpräparate sofort nach ihrer Herstellung aufgezogen, entwässert, geklärt und eingebettet. Ebenso wurden stets direkt nach der Methode Unna-Pappenheim gefärbte

Präparate angefertigt; dasselbe geschah in der Mehrzahl der Versuche mit einzelnen, durch Dopalösung vorbehandelten Schnitten.

So lagen uns also gewöhnlich zur Untersuchung und zum Vergleich beim einzelnen Versuche vor:

1. Nativschnitte. Das sind ohne weitere Behandlung aufgezogene und nach Entwässerung und Klärung in Kanadabalsam eingebettete Gefrierschnitte.

2. Gefärbte (Unna-Pappenheim) Schnitte. Das sind Gefrierschnitte, die ohne andere Beeinflussung aufgezogen, nach Unna-Pappenheim gefärbt, entwässert, geklärt und eingebettet wurden.

3. Gefrierschnitte, die 24 Stunden bei Zimmertemperatur in 1 ‰ Dopalösung lagen, dann eingebettet wurden (= Dopaschnitte Z).

4. Gefrierschnitte, die 24 Stunden bei 37° in 1 ‰ Dopalösung lagen (= Dopaschnitte 37°).

5. Gefrierschnitte, die nach 3 und 4 vorbehandelt und dann vor der Einbettung nach Unna-Pappenheim nachgefärbt wurden.

6. Gefrierschnitte, die zunächst eine gewisse, in den einzelnen Versuchen wechselnde Zeit irgendwelchen chemischen oder physikalischen Einflüssen ausgesetzt wurden und dann nach 1, 2, 3, 4 oder nach 5 behandelt wurden (= Kontrollschnitte).

Bei allen Versuchen, wo nicht ausdrücklich etwas anderes erwähnt ist, handelt es sich um Versuche 1 ‰ Lösung von razemischem Dioxyphenylalanin, das, ohne Anwendung von Natrium bisulfuros dargestellt worden war (wegen der schädigenden Wirkung von Natr. bisulfuros. auf das Ferment).

II.

Übersicht über die angestellten Versuche.

A. Chemische Beeinflussungen.

1. Lösungsmittel und Fällungsmittel.

a) Destilliertes Wasser.
b) Physiolog. Kochsalzlösung.
c) Aethylalkohol verschiedener Konzentration.

d) Fettlösende Mittel (Äther, Chloroform, Aceton).
e) Ammonsulfat.

2. Säuren und Laugen.

a) Natronlauge 1/10 normal.
b) Salzsäure 1/10 normal.
c) Schwefelsäure 1/10 normal.

3. Reduzierende Mittel.

a) Dextrose.
b) Formalin.
c) Phenylhydrazin.
d) Natrium bisulfurosum.
e) Natrium hydrosulfit.

4. Toluol.

5. Alkaloide.

a) Cocainum hydrochloricum.
b) Morphinum hydrochloricum.

6. Cyanwasserstoff.

7. Ablauf der Reaktion bei Abwesenheit von freiem Sauerstoff.

B. Physikalische Beeinflussungen.

1. Temperaturversuch.

Alles Weitere soll im Folgenden bei der Beschreibung der Versuchsanordnung genau ausgeführt werden.

III.

Versuchsprotokolle und Versuchsergebnisse.

A. Beeinflussungen chemischer Natur.

1. Lösungsmittel und Fällungsmittel

a) destilliertes Wasser.

Versuch 1.

Meerschweinchen 120, Exzision am Übergang der pigmentierten in die weisse Haut. Pigmentierte Haut hellgelb mit hellbraunen Haaren.

Es werden folgende Schnitte hergestellt:

1. Nativschnitt.
2. Schnitte, die 24 Stunden in optisch aktiver Dopalösung bei Zimmertemperatur lagen.
3. Schnitte, die 24 Stunden in racemischer Dopalösung bei Zimmertemperatur lagen.
4. Schnitte, wie vorhergehende, aber bei 37°.
5. Schnitte, die 24 Stunden in aqua dest. lagen, dann 24 Stunden in Dopa racemisch 37°.
6. Schnitte wie 2, aber bei 37°.
7. Schnitte, an denen die Indophenolreaction angestellt wird.

ad 1) Nativschnitt. Auf der einen Hälfte des Schnittes sind die Haare völlig hell und pigmentlos. Auf der andern Schnitthälfte in Bulbus und Schaft ziemlich reichlich goldbraunes Pigment. Das Pigment ist vorwiegend ganz feinkörnig, zum teil aber auch diffus.

Die Basalschicht der Epidermis ist pigmentfrei. Das Bindegewebe der Cutis ist ziemlich zellreich.

ad 2) Dopa optisch aktiv, Zimmertemperatur. Die Reaktion ist ganz minimal und zeigt sich nur darin, dass die im Nativschnitt gelbgekörnten Zellen der Haarmatrix an manchen Stellen einen gelbbraunen Farbton tragen.

ad 6) Dopa optisch aktiv 37°. Die Reaktion ist sehr deutlich. Die Haarbulbi sind dunkel braunschwarz. Die Reaktion be-

schränkt sich auf den Bulbus und ist bereits im Halse des Bulbus angedeutet. Im Haarschaft ist sie völlig negativ. Bei Immersion zeigt sich, dass die Zellen der Haarmatrix zum Teil in toto in braunschwarze Massen verwandelt sind. In weniger stark reagierenden Zellen ist das Protoplasma, diffus oder granulär, dunkelbraun gefärbt. Die Reaktion beschränkt sich lediglich auf die Bulbi der pigmentierten Haare. Die Bulbi der weissen Haare weisen keine Spur einer Reaktion auf. Äusserst stark reagieren ferner die über den ganzen Schnitt zerstreuten sehr zahlreichen Leukozyten. Sie imponieren als dunkle, braunschwarze Klümpchen, die in der ganzen Cutis und Subcutis zerstreut sind und oft unterhalb der Epidermis Grüppchen bilden (cf. Indophenolkontrolle).

ad 3) Dopa racemisch, Zimmertemperatur. Die Reaktion ist schwächer als in 2, kaum angedeutet.

ad 4) Dopa racemisch, 37°. Die Reaktion ist deutlich positiv. Sie entspricht in ihrer Verteilung genau dem Schnitt sub 6), quantitativ aber ist sie entschieden schwächer und zwar speziell in den Haarbulbi. Diese sind in allen Schnitten heller als die bei Dopa aktiv. Die Zellen der Cutis hingegen reagieren in beiden gleich stark.

ad 5) destilliertes Wasser, 24 Stunden, dann Dopa rac. 37°. Die Reaktion in den Bulbi ist stark abgeschwächt. Es besteht nur noch eine schwache Graubraunfärbung einzelner Bulbi.

ad 7) Indophenolreaktion. Die Bulbuszellen geben keine Spur von Reaktion. Sämtliche Zellen der Cutis dagegen, welche Dopa schwarz färben, sind bei dieser Reaktion blau, enthalten also die Polyphenolaxydase.

Versuch 2.

Meerschweinchen 207. Haut braun, Haare braun.
Es werden folgende Schnitte hergestellt:

1. Nativschnitt.
2. Unna-Pappenheimschnitt.
3. Schnitte, die 12 Stunden in aqua dest. lagen, dann teils sofort aufgezogen, teils in Dopalösung bei Zimmertemperatur, teils in Dopalösung bei 37° für 24 Stunden gebracht wurden. Von jeder Kategorie wurden einzelne Schnitte nach Unna-Pappenheim nachgefärbt.

4. Schnitte, wie 3, aber 24 Stunden in aqua dest.
5. Einfache Dopaschnitte, Zimmertemperatur und 37°.

I. Versuchsanordnung.

Die Schnitte wurden für 24 Stunden in destilliertes Wasser gebracht. Dann wurden sie bei Zimmer- und bei Brutschranktemperatur der Einwirkung einer 1‰igen Dopalösung überlassen, aufgezogen, entwässert, geklärt und in Kanadabalsam eingebettet. Einzelne wurden auch noch vorher nach Unna-Pappenheim gefärbt. Als Kontrolle dienten 1, 5, 2, und Schnitte, die 24 Stunden in aqua dest. lagen und teilweise nach Unna-Pappenheim gefärbt, aber der Dopalösung nicht überlassen wurden.

II. Schnittprotokolle.

1. 24 Stunden destilliertes Wasser, dann Dopa-Zimmertemperatur. Der Schnitt ist makroskopisch, etwas heller als der einfache Dopa-Zimmertemperaturschnitt. Mikroskopisch erweist sich die Reaktion als erhalten; in einzelnen Bulbi und in der Basalzellschicht der Epidermis ist sie etwas abgeschwächt. Die Reaktion der Leukozyten ist gleich stark wie im einfachen Dopa-Kontrollschnitt.

2. 24 Stunden aqua dest., dann 24 Stunden Dopa 37°. Die Verhältnisse gegenüber dem einfachen Dopa 37° Schnitt sind dieselben wie bei 1 gegenüber dem einfachen Dopa-Zimmertemperaturschnitt.

Resultat aus Versuch 1 und 2. Die Einwirkung von Wasser vernichtet die Oxydase nicht vollständig, denn eine Reaktion ist noch deutlich erkennbar, jedoch tritt unter dem Einflusse des Wassers eine merkliche Abschwächung der Oxydase auf. Die Oxydase in den Leukozyten wird durch Wasser nicht, oder nur in sehr geringem Grade geschädigt.

b) Physiologische Kochsalzlösung.

Versuch 1.

Meerschweinchen 207, Haut und Haare dunkelbraun.

I. Versuchsanordnung.

Die Schnitte werden in der üblichen Weise hergestellt und dann für 12 und 24 Stunden bei Zimmertemperatur in physiologische Kochsalzlösung gebracht. Darauf werden sie in destil-

liertem Wasser ausgewaschen und teils aufgezogen, teils für weitere 24 Stunden bei 37° und bei Zimmertemperatur der Einwirkung der Dopalösung überlassen.

Als Kontrollen dienen; Nativ- und Unna-Pappenheim-Präparate und einfache Dopa-Zimmertemperatur und Dopa 37° Schnitte.

II. Schnittbilder.

1. Dopa-Zimmertemperatur. Die Reaktion ist stark positiv. Die Bulbi imponieren als schwarzbraune bis kohlschwarze Kolben. Die Basalzellen der Epidermis sind ebenfalls tief schwarzbraun und erscheinen als schwarzes kontinuierliches Band. Die Leukozyten repräsentieren undurchsichtige schwarze Pünktchen und Klümpchen.

2. Dopa 37°. Der Schnitt erscheint makroskopisch dunkelbraun, mikroskopisch zeigt sich in allen Teilen eine sehr starke positive Reaktion.

3. Phys. Kochsalzlösung, 24 Stunden, dann Dopa-Zimmertemperatur. Makroskopisch ist der Schnitt etwas heller als die Dopakontrolle (1).

Mikroskopisch ist eine Reaktion der Bulbi noch vorhanden, aber gegenüber der Kontrolle erheblich abgeschwächt. Die gleiche Abschwächung findet sich auch in den Leukozyten. Die Haarbulbi sind nicht mehr tief schwarz, sondern zeigen nur noch eine schwach graue Farbe.

4. Wie 3, aber bei 37°. Die Abschwächung in den Bulbi ist hier noch entschieden deutlicher, als in den Zimmertemperaturpräparaten. Im übrigen sind die Verhältnisse genau die gleichen.

Versuch 2.

Meerschweinchen 120, Haut und Haare hellgelb.

I. Versuchsanordnung.

Die Anordnung ist im allgemeinen gleich, wie in Versuch 1, nur dass die Präparate in eine Lösung von racemischem Dopa bei 37° gebracht wurden.

II. Schnittbilder.

1. Dopa racemisch, 37°. Die Reaktion ist in allen Teilen, in Bulbi, Epidermis und Leukozyten positiv. In den Leukozyten ist sie sehr stark, in Epidermis und Bulbi nur sehr

mässig aufgetreten. Diese erscheinen nur graubraun anstatt kohlschwarz.

2. Physiolog. Kochsalzlösung 24 Stunden, sonst wie 1. Die Reaktion ist in geringem Grade abgeschwächt, die Bulbi sind weniger intensiv braun gefärbt als in 1.

III. Versuchsresultate aus Versuch 1 und 2.

Beide Versuche ergeben eine geringe Schädigung, sowohl des Leukozyten-, als des Bulbusfermentes durch phys. Kochsalzlösung.

c) Aethylalkohol, verschiedener Konzentration.

Meerschweinchen 207, Haut und Haare braun.

I. Versuchsanordnung.

Die Schnitte werden in der üblichen Weise hergestellt. Um ein Zusammenrollen beim Einlegen in den Alkohol zu verhüten, wurde jeder Schnitt sorgfältig zunächst auf einen Objektträger aufgezogen und dann in Alkohol abgeschwemmt. Als Alkoholkonzentrationen wurden verwandt: Alkohol absolutus, Alkohol 80%, Alkohol 50%. Die Schnitte verblieben 24 Stunden im Alkohol, wurden dann in destilliertem Wasser ausgewaschen und bei 37° und Zimmertemperatur in Dopalösung gebracht. Als Kontrollen dienten einfache Nativ-, Unna-Pappenheim-, Dopa-Zimmertemperatur- und Dopa-Brutschrankpräparate.

II. Schnittbilder.

1. Dopa-Zimmer- und Brutschrankpräparat. Die Reaktion ist positiv. Eine genaue Beschreibung ist nicht notwendig, da das Bild durchaus dem der frühern Versuche gleicht.

2. Alkohol 50%, dann Dopa-Zimmertemperatur. Makroskopisch ist gegenüber der Kontrolle kein Farbenunterschied wahrnehmbar, mikroskopisch ist die Reaktion ganz schwach. Die Bulbi sehen etwas geschrumpft aus und zeigen eine sehr geringe Dunkellärbung. Dasselbe gilt punkto Färbung für die reagierenden Zellen der Basalschicht. Die Leukozyten zeigen nur eine geringe Abschwächung.

3. Alkohol 50%, dann Dopa 37°. Die Abschwächung der Reaktion in den Bulbi ist noch viel deutlicher als bei 2). Die Reaktion ist nur noch minimal vorhanden.

4. Alkohol 80%, Dopa-Zimmertemperatur. Die Reaktion ist bedeutend stärker, als bei 50%igem Alkohol. Die Bulbi sind z. T. ziemlich dunkel. Gegenüber den einfachen Dopaschnitten macht sich aber immerhin noch eine deutliche Abschwächung geltend. Die Leukozyten reagieren stark positiv, sie sind nicht abgeschwächt.

5. Alkohol 80%, Dopa 37°. Die Beurteilung ist schwierig; das Bindegewebe ist stark geschrumpft und intensiv dunkelbraun gefärbt. In den Bulbi ist die Abschwächung viel deutlicher als bei 4.

6. Alkohol absolutus, Dopa-Zimmertemperatur. Die Bulbi sind stark geschrumpft. Die Reaktion ist noch vorhanden, unterscheidet sich aber wenig von den Verhältnissen der Schnitte zu 4 und 5, indem auch hier eine Abschwächung erkennbar ist, die aber jedenfalls geringer ist, als bei Alkohol 50%.

7. Alkohol absolutus, Dopa 37°. Die Verhältnisse liegen wie bei 5. Die Abschwächung ist sicher vorhanden und ziemlich erheblich.

III. Versuchsresultat.

Alkohol schädigt in jeder Konzentration. Die Schädigung ist umso stärker, je verdünnter der Alkohol ist, was vielleicht die Annahme zulässt, dass das Ferment nicht durch den Alkohol, sondern durch das Wasser geschädigt, d. h. ausgewaschen wird.

d) Fettlösende Mittel (Äther, Chloroform, Aceton).

Meerschweinchen 270. Haare hellbraun, Haut dunkelbraun.

I. Versuchsanordnung.

Um die fettlösenden Mittel wirksam zu machen, war es zunächst nötig, die auf gewöhnlichem Wege hergestellten Schnitte zu entwässern. Es geschah dies dadurch, dass die Schnitte 5 bis 7 Min. in Alkohol von 96% gebracht wurden. Als fettlösende Substanzen wurden verwendet Aceton purissimum, Chloroform und Äther pro narcosi »Roche«. Die mit Alkohol vorbehandelten Schnitte blieben für 24 Stunden in verschlossener Schale in einer der Flüssigkeiten liegen, wurden dann teils aufgezogen und eingebettet, um als Kontrollen zu dienen, teils nach Unna-Pappenheim gefärbt, teils endlich für 24 Stunden bei Zimmertemperatur in 1‰ Dopalösung gebracht.

Als Kontrollen dienten ferner einfache Nativ- und Pappenheimpräparate, einfache Dopa-Zimmerschnitte und Schnitte, die 24 Stunden in destilliertem Wasser lagen, dann der Dopareaktion unterzogen wurden, endlich, um eine allfällige Schädigung durch die Vorbehandlung mit Alkohol kontrollieren zu können, Schnitte, die einfach 5—7 Min. in Alkohol lagen und dann sofort in Dopalösung gebracht wurden.

II. Schnittbilder.

1. Dopa-Zimmertemperatur. Schnitt dunkelbraun. Bulbi dunkel graubraun bis grauschwarz, d. h. starke Reaktion. Die Leukozyten sind intensiv gefärbt und imponieren als braunschwarze Klumpen.

2. Alkoholkontrolle, Dopa-Zimmertemperatur. Die Reaktion ist sehr stark positiv, in den Leukozyten stellenweise etwas abgeschwächt. Die Basalzellschicht der Epidermis imponiert als kontinuierlicher schwarzer Streifen. Die Bulbi sind braunschwarz, die Reaktion ist in ihnen nicht ab-abgeschwächt.

3. Äther, Dopa-Zimmertemperatur. Der ganze Schnitt ist etwas geschrumpft. Die Reaktion ist in einzelnen Bulbi vielleicht etwas abgeschwächt, in den meisten aber noch sehr deutlich positiv. Die Bulbi sind dunkelbraun bis schwarzbraun. In der Basalschicht ist die Reaktion noch vorhanden, aber gegenüber der Kontrolle deutlich schwächer; die reagierenden Basalzellen sind entschieden heller. Die Leukozyten zeigen ebenfalls eine etwas stärkere Abschwächung, sie sind hell graubraun.

4. Azeton, Dopa-Zimmertemperatur. Die Bulbi reagieren sehr deutlich positiv, sie sind braunschwarz. Eine Abschwächung ist nicht erkennbar. Die Basalschicht besitzt ebenfalls positive Reaktion, doch ist diese entschieden nicht von normaler Stärke. Die Leukozyten sind mehr oder minder braun gefärbt, aber im allgemeinen deutlich weniger dunkel als im Kontrollschnitt, also abgeschwächt.

5. Chloroform, Dopa-Zimmertemperatur. In den Bulbi ist die Reaktion noch vorhanden, aber häufig etwas abgeschwächt. Die Farbe ist mehr dunkelbraun als braunschwarz. Die Reaktion in der Basalschicht ist stärker abgeschwächt als in den Bulbi, oft nur noch als diffuse Braunfärbung angedeutet, jedoch ist noch eine sicher konstatierbare Reaktion vorhanden.

III. Versuchsresultat.

Bei allen untersuchten fettlösenden Mitteln wird das Ferment wenig geschädigt, aber nie ganz vernichtet, am geringsten ist die Schädigung stets in den Bulbi, am stärksten in den Leukozyten, was eine geringere Widerstandskraft der Polyphenoloxydase gegenüber den fettlösenden Mitteln anzeigt. Von den verschiedenen Substanzen scheint Äther am wenigsten, Chloroform den stärksten schädigenden Einfluss auszuüben.

e) Ammonsulfat.

Versuch 1.

Meerschweinchen 204, Haut und Haare braun.

I. Versuchsanordnung.

Schnitte werden in üblicher Weise hergestellt. Ein Teil der Schnitte kommt für 12, ein anderer für 24 Stunden in eine gesättigte wässerige Ammonsulfatlösung. Der Rest wird ebenfalls durch 12 oder 24 Stunden in eine halbgesättigte, aus der gesättigten durch Verdünnung hergestellte Ammonsulfatlösung gebracht. Nach Ablauf der betr. Zeiten werden die Schnitte in destilliertem Wasser ausgewaschen und für 24 Stunden in Dopalösung, bei Zimmertemperatur und bei 37°, gebracht. Als Kontrollen dienen: Nativ-, Unna-Pappenheim-, einfache Dopa-Zimmertemperatur- und Dopa-37°-Schnitte, sowie Schnitte, die vor der Dopabehandlung 12 und 24 Stunden in destilliertem Wasser lagen.

II. Schnittbilder.

Für die Beschreibung des Nativschnittes, sowie der einfachen Dopa-Zimmertemperatur und 37° Schnitte verweise ich auf die früher angeführten Versuche, da die Schnitte dieselben sind.

1. Ammonsulfat, halbgesättigt, 12 Stunden-Dopa-Zimmertemperatur. Bulbi und Basalzellschicht sind ganz reaktionslos. Die Bulbi sind rein goldbraun, die Basalzellen weisen ebenfalls nur das native Pigment auf. Die Leukozyten reagieren an einzelnen Stellen noch; sie sind dunkelbraun bis braunschwarz.

2. Ammonsulfat gesättigt, sonst wie 1. Die Reaktion in den Haarbulbi ist ganz negativ. Das Nativpigment ist er-

halten. Das Bindgewebe ist völlig hell, die Leukozyten weisen eine sehr stark abgeschwächte Reaktion auf. Sie sind hellgrau bis grauschwarz, an verschiedenen Stellen wechselnd. Makroskopisch erscheinen die Schnitte ganz hell.

3. Ammonsulfat, halbgesättigt 12 Stunden-Dopa 37°. Die Reaktion ist negativ. Vereinzelte Bulbi sind vielleicht etwas dunkler braun als im Nativschnitt. Die Leukozyten reagieren sehr stark positiv. Sie bilden vollständig undurchsichtige, kohlschwarze Klümpchen.

4. Ammonsulfat gesättigt 12 Stunden-Dopa 37°. Makroskopisch sind die Schnitte ziemlich dunkel, nicht gequollen. Mikroskopisch ist in den Bulbi die Reaktion meist negativ, nur in einzelnen Keulen scheint die Färbung etwas dunkler zu sein (Spur von einer Reaktion?). In den Leukozyten ist die Reaktion sehr stark positiv. Sie sind alle undurchsichtige schwarze Klumpen.

Ammonsulfat, halb- und ganzgesättigt, bei Brutschranktemperatur ergibt für die Leukozyten eine meist eben so starke Reaktion wie das einfache Dopapräparat.

5. Ammonsulfat, gesättigt, 24 Stunden-Dopa 37°. Die Reaktion der Leukozyten ist durchwegs sehr deutlich positiv. Sie sind von schwarzer Farbe. Die Zellen der Haarmatrix sind stellenweise etwas dunkler als im Nativschnitt. Eine eigentliche Reaktion ist nicht vorhanden.

6. Ammonsulfat, gesättigt, 24 Stunden-Dopa-Zimmertemperatur. Die Reaktion in den Bulbi ist negativ. Einzelne Zellen der Haarmatrix weisen vielleicht eine Spur dunklere Färbung auf als die entsprechenden Zellen des Nativschnittes. In den Leukozyten ist die Reaktion negativ.

7. Ammonsulfat, halbgesättigt, 24 Stunden-Dopa-Zimmertemperatur. In den Haarbulbi ist die Reaktion negativ. Hie und da findet sich einmal eine dunkler gefärbte Matrixzelle. Die Reaktion der Leukozyten ist negativ. Sie sind nicht, oder nur als ganz schwachbraune Schatten erkennbar.

8. Ammonsulfat, halbgesättigt, 24 Stunden-Dopa 37°. Die Bulbi reagieren völlig negativ. Die Leukozyten haben deutlich positive Reaktion. Sie imponieren als undurchsichtige, schwarzbraune Klümpchen.

III. Versuchsresultat.

Durch Ammonsulfatlösung, halb- und ganzgesättigte, wird die spezifische Reaktion der in Bulbi und Basalepithelzellen enthaltenen Dopa-Oxydase schwer beeinträchtigt oder ganz aufgehoben, während die in den Leukozyten enthaltenen Polyphenoloxydase, sofern die Schnitte nach der Einwirkung des Ammonsulfat in Dopalösung bei optimaler Temperatur von 37° gebracht werden, noch eine positive Reaktion gibt und keine oder nur geringe Schädigung nachweisen lässt.

Versuch 2.

Bei Entzündung, hervorgerufen durch Crotonöl. Meerschweinchen 272. Haut und Haare dunkelbraun.

I. Versuchsanordnung.

Um eine Entzündung mit möglichst vielen polynukleären Leukozyten hervorzurufen, wandte ich Crotonöl an. Ich bepinselte zwei Hautstellen von ca. je 1 cm^2 mit je einer 25 und einer 50% Crotonöllösung in Neutral-Glycerin. Nach 16 Stunden wies die Haut an beiden Stellen eine intensive Rötung und Schwellung auf. An der mit 50% Crotonöllösung bepinselten Stelle war die Epidermis in mässigem Grade in kleinen Bläschen abgehoben. Excision und Herstellung der Gefrierschnitte in üblicher Weise. Die Schnitte wurden für 12 Stunden in eine halb gesättigte Ammonsulfatlösung, gebracht, nachher ausgewaschen und für 24 Stunden in Dopalösung bei Zimmer- und Brutschranktemperatur gelegt. Als Kontrollen dienten einfacher Nativ- und Unna-Pappenheimschnitt, Dopa-Zimmertemperatur und 37° Schnitt. Sowohl bei Schnitten, die in Ammonsulfat lagen als bei einfachen Nativschnitten wird die Indophenolreaktion hergestellt, um das Verhalten der Polyphenoloxydase gegenüber Ammonsulfat zu beobachten.

II. Schnittbilder.

1. Unna-Pappenheim Präparat, 25% Crotonöl. Die ganze Epidermis ist nekrotisch abgehoben. Der Papillarkörper und die Cutis sind stark infiltriert.

2. Indophenolreaktion, 25% Crotonöl, kein Ammonsulfat. Der im Pappenheim-Präparat deutlich sichtbare Leu-

kozytenwall im Papillarkörper gibt eine stark positive Indophenolreaktion. Er erscheint als kobaltblauer Streifen. Die einzelnen Zellen lassen sich jedoch nicht genau auseinanderhalten. An ihrer Stelle ist bei starker Vergrösserung eine Unmenge kleiner kobaltblauer Granula zu erkennen. Die nekrotisch abgehobene Epidermis ist in ihren obersten Schichten violettrot, ebenso das subkutane Fett und die Talgdrüsen (Fettfärbung nach Schultze). Die übrige Epidermis und die Haarschäfte sind blass bläulich gefärbt.

3. Indophenolreaktion, 50% Crotonöl, ohne Ammonsulfat. Die Verhältnisse gleichen durchaus denen in 2, nur dass der Leukozytenwall noch stärker ist.

4. Dopa-Zimmertemperatur, 25% Crotonöl, kein Ammonsulfat. Die Reaktion der Bulbi ist positiv. Sie sind dunkelbraun, nicht grau und nicht schwarz. Das Infiltrat gibt eine sehr schwache Reaktion, graubraune Färbung. Die abgestossene Epidermis bildet einen dunkelbraunen Streifen.

5. Dopa 37°, sonst wie 4. Das Infiltrat stellt sich als eine intensiv dunkelbraune Masse dar. In den Bulbi ist die Reaktion eher etwas schwächer als bei Zimmertemperatur. Epidermis wie bei 4.

6. Unna-Pappenheim, 50% Crotonöl. Histologisch ist das Bild ganz gleich wie in 1. Das Infiltrat im Papillarkörper ist etwas stärker und dichter.

7. Dopa-Zimmertemperatur, 50% Crotonöl, kein Ammonsulfat. Die Reaktion ist positiv. In den Bulbi schwarzbraune Kolben. Die Basalschicht der losgelösten Epidermis bildet einen schwarzen Streifen. Die Reaktion ist also positiv. Ganz schwach, teilweise negativ, erscheint die Reaktion der Leukozyteninfiltrate.

8. Wie 7, aber 37°. Die Bulbi reagieren positiv, eher etwas schwächer als in 7. Die Leukozyten besitzen sehr stark positive Reaktion. Sie bilden förmlich schwarze Klumpen und Ausgüsse der Papillen. Nur dort, wo die Leukozyten bereits nekrotisch sind, ist die Reaktion schwach. In den Basalzellen ist die Reaktion etwas schwächer als bei Zimmertemperatur.

9. Ammonsulfat-Indophenolschnitt, 25 und 50% Crotonöl. Die Indophenolreaktion der Leukozyteninfiltrate ist stark positiv. Der Schnitt entspricht durchaus dem sub 2 und 3 beschriebenen.

10. Ammonsulfat-Dopa-Zimmertemperatur, Crotonöl 25%. Die Bulbi sind nur noch bräunlich gefärbt. Die Reaktion ist fast gleich 0. In der Basalschicht ist die Reaktion ebenfalls sehr stark abgeschwächt. Die Leukozyten zeigen eine mehr graue Färbung. Die Reaktion ist eher schwach, ungefähr wie im Kontrollpräparat.

11. Schnitt wie 10, aber bei 37°. Die Reaktion der Leukozyten ist nicht abgeschwächt, sie ist ebenso stark wie im gewöhnlichen Dopa-37°-Präparat. Die Reaktion der Bulbi ist schwer zu bestimmen, scheint aber eher schwächer zu sein.

12. Ammonsulfat, Dopa-Zimmertemperatur, Crotonöl 50%. Die Reaktion der Bulbi ist gleich 0. In den Leukozyten ist sie deutlich vorhanden, gegenüber den Schnitten ohne Ammonsulfatbehandlung nicht abgeschwächt.

13. Ammonsulfat, Dopa 37°, Crotonöl 50%. Der Schnitt verhält sich ganz gleich, wie der Schnitt mit 25% Crotonöl (11).

III. Versuchsresultat.

Der Versuch ergibt, dass Ammonsulfat sicher bei Zimmertemperaturpräparaten die Reaktion der Dopaoxydase herabsetzt, also das spezifische Pigmentferment schädigt. Teilweise scheint es sogar, als ob Ammonsulfat eine vollständige Vernichtung herbeiführe. Demgegenüber steht die stets unveränderte Reaktion der leukozytären Phenolase, die also offenbar Ammonsulfat gegenüber widerstandsfähiger ist, als die Dopaoxydase. Dass die Leukozyten überhaupt mässig reagieren, scheint mir seinen Grund in der akuten mit Nekrose verbundenen Crotonölentzündung zu haben.

2. Säuren und Laugen.

Meerschweinchen 204, Haut und Haare dunkelbraun.

a) Natronlauge 1/10 normal.

I. Versuchsanordnung.

Die Schnitte werden in üblicher Weise hergestellt, dann während 2 Stunden in 1/10 normale Natronlauge gelegt und darauf in mit Essigsäure angesäuertem Wasser ausgewaschen. Die so vorbehandelten Schnitte wurden dann für 24 Stunden

der Einwirkung der Dopalösung überlassen, und zwar sowohl bei Zimmertemperatur, als bei 37°. Darauf Einbettung. Als Kontrollen dienten: Nativ-, Unna-Pappenheim-, einfache Dopa-Zimmertemperatur und Dopa-37° Präparate.

II. Schnittbilder.

1. Nativschnitt. Die Haare sind braungelb; sowohl in den Haarmatrixzellen als im Haarschaft findet sich reichlich braunes bis braungelbes Pigment, teils diffus, teils feinkörnig. Auch die Basalzellen der Epidermis weisen haufenweise bräunliches feines Pigment auf, das jedoch viel dunkler braun ist als das Pigment der Haare.

2. Dopa-Zimmertemperatur. Die Reaktion ist sehr deutlich. Sämmtliche Bulbi sind rein schwarz bis braunschwarz gefärbt. Die Färbung der Haarmatrixzellen ist vorzugsweise eine diffuse; stellenweise finden sich einige Granula im Protoplasma der Matrixzellen. Die Basalzellen reagieren ebenfalls positiv. Ihr Protoplasma ist teils diffus grauschwarz, teils sehr deutlich granuliert. Die in der Kutis vorhandenen Leukozyten zeigen ebenfalls positive Reaktion. Sie sind kohlschwarz. Die Haarschäfte sind gelb wie im Nativpräparat.

3. Dopa 37°. Die Reaktion ist dieselbe, wie im Dopa-Zimmertemperatur-Präparat, nur, dass die Färbung, sowohl in den Bulbi, als in der Basalschicht, viel dunkler ist. Auch das Bindegewebe zeigt eine intensive Braunfärbung.

4. Natronlauge 1/10 N., Dopa-Zimmertemperatur. Der ganze Schnitt ist etwas gequollen und viel blasser als der einfache Dopa-Zimmertemperatur-Schnitt. Die Reaktion ist völlig negativ, sowohl in der Epidermis, als in den Bulbi, als in den Leukozyten. Es findet sich lediglich eine blassgraue Färbung des Kutisbindegewebes. Das im Nativschnitt in Epidermis und Bulbis vorhandene Pigment ist in seiner ursprünglichen Farbe erhalten.

5. Natronlauge 1/10 N. Dopa 37°. Der Schnitt erscheint mikroskopisch viel dunkler als der vorhergehende. Er ist ebenfalls etwas gequollen, breiter als der einfache Dopaschitt. Das Bindegewebe ist diffus braun gefärbt. Es besteht keine Spur einer Reaktion, weder in der Haarmatrix, noch in der Epidermis, noch in der Kutis.

III. Versuchsresultat des Laugenversuchs.

Natronlauge vernichtet in geringer Konzentration und in sehr kurzer Zeit jegliche Reaktionsfähigkeit des Fermentes vollständig.

b und c. Salzsäure und Schwefelsäure 1/10 normal

I. Versuchsanordnung.

Sie ist genau gleich, wie beim Laugenversuch, mit dem einzigen Unterschied, dass zum Auswaschen der mit Säuren vorbehandelten Schnitte einfaches Brunnenwasser verwendet wurde.

II. Schnittbilder.

1. Nativschnitt, 2. Dopazimmertemperaturschnitt, 3. Dopa 37°-Schnitt verhalten sich ganz genau gleich wie im Laugenversuch.

4. Schwefelsäure 1/10 N. Dopa-Zimmertemperatur. Der Schnitt ist makroskopisch hell und völlig farblos, etwas gequollen. Mikroskopisch ist der Schnitt ziemlich gut erhalten. Die Reaktion ist vollständig negativ, sowohl in den Haarbulbi, als in der Basalschicht, als in den Leukozyten. Sehr gut erhalten ist das native Pigment der Haarschäfte.

5. Schwefelsäure 1/10 N. Dopa 37°. Es ist keine Spur einer Reaktion vorhanden. Das braune Nativpigment ist erhalten.

6. Salzsäure 1/10 N. Dopa-Zimmertemperatur. Der Schnitt ist makroskopisch farblos, deutlich gequollen und vollständig hell. Die Reaktion ist ganz negativ. In Epidermis, Bulbi und Kutis ist das nat. Pigment gut erhalten.

7. Salzsäure 1/10 N. Dopa 37° Die Reaktion ist ebenfalls ganz negativ, hie und da zeigt ein Balbus eine ganz leichte Verfärbung.

III. Versuchsresultat.

Säuren heben die Reaktionsfähigkeit der Dopaoxydase vollständig auf.

3. Reduzierende Mittel.

a. Dextrose.

I. Versuchsanordnung.

Die Schnitte werden in der üblichen Weise aus der Haut eines dunkelbraunen Meerschweinchens hergestellt. Die Haare

des Tieres (Nr. 269) sind ebenfalls dunkelbraun. Als Kontrollen werden eine Anzahl Schnitte zu einfachen Nativ-Unna-Pappenheim und Dopapräparaten verarbeitet.

Was den Versuch selbst betrifft, so wird je eine 1‰, 1% und 5% Dextrose-Lösung hergestellt und die Schnitte für 24 Stunden dareingelegt. Dann werden sie in dest. Wasser ausgewaschen und weiterverarbeitet.

II. Schnittbilder.

1. Einfaches Dopa-Zimmerpräparat. Die Reaktion ist stark positiv. Die Bulbi sind tief graubraun bis schwarzbraun bis kohlschwarz gefärbt. Der Haarschaft ist goldgelb wie im Nativpräparat. Die Basalschicht der Epidermis weist ebenfalls positive Reaktion auf. Die dendritischen pigmentführenden Zellen sind tiefschwarz, stellenweise zu einem kontinuierlichen Bande verschmolzen. Die Leukozyten sind mässig zahlreich. Sie imponieren als undurchsichtige, kohlschwarze Klümpchen.

2. Einfaches Dopa- 37° Präparat. Die Reaktion ist stark positiv und zwar sowohl in Bulbi, als in der Epidermis, als in den Leukozyten. Die Cutis ist in toto tief braunschwarz; die Basalschicht der Epidermis imponiert als kontinuierliches schwarzes Band.

3. Dextrose. 1‰, dann Dopa-Zimmertemperatur. Die Reaktion ist deutlich positiv, aber schwächer als im einfachen Doppelpräparat (1). Die Bulbi erscheinen blassgrau bis grauschwarz; das Basal-Epithel imponiert nicht mehr als schwarzes Band, sondern die einzelnen Zellen sind deutlich abgegrenzt. Sie besitzen eine graubraune, sehr feinkörnige Färbung. Die Leukozyten reagieren ebenso stark wie in 1, sie sind grösstenteils kohlschwarz und stellenweise in Klümpchen angehäuft.

4. Dextrose 1‰, dann Dopa 37°. Der Schnitt erscheint schon makroskopisch bedeutend heller als der entsprechende einfache 37° Schnitt (2). Mikroskopisch erweist sich die Reaktion in Bulbi und Epidermis als bedeutend abgeschwächt, aber noch deutlich positiv. Die Reaktion der Leukozyten ist in keiner Weise verändert; sie verhalten sich durchaus wie in der Kontrolle. Die Cutis ist in toto hellbraun gefärbt.

5. Dextrose 1%, dann Dopa-Zimmertemperatur. Die Reaktion ist noch stärker abgeschwächt, als im Versuch mit 1‰ Dextrose-Lösung. Die Bulbi sind nur noch ganz blass

hellgrau, einzelne etwas dunkler bis grauschwarz. In der Basalzellschicht der Epidermis ist die Reaktion nahezu gleich 0. In den Leukozyten dagegen ist gegenüber der Kontrolle keine Veränderung wahrnehmbar.

6. Dextrose 1 %, dann Dopa 37°. Das Präparat entspricht in jeder Beziehung dem vorhergehenden, nur dass die Reaktion noch um einen geringen Grad stärker ist.

7. Dextrose 5 %, dann Dopa-Zimmertemperatur. Die Reaktion ist in den Bulbi noch ganz schwach positiv, nahezu gleich 0. Sie erscheinen als blassgraue, feinkörnige Keulen. In der Epidermis ist die Reaktion vollständig aufgehoben. Die Leukozyten erscheinen noch als blassgraue Punkte. Auch hier ist also eine Abschwächung der Reaktion eingetreten.

8. Dextrose 5 %, dann Dopa 37°. Die Reaktion ist in allen in Betracht kommenden Zellen noch vorhanden, etwas stärker als in 7, aber gegenüber allen vorhergehenden Versuchen stark abgeschwächt.

III. Versuchsresultat.

Durch eine Vorbehandlung mit Dextroselösung wird das Auftreten der spezifischen Reaktion stark im negativen Sinne beeinflusst. Je konzentrierter die Lösung, umso schwächer die Reaktion, umso stärker also die Schädigung der Dopa-Oxydase. Dabei verhalten sich die verschiedenen reagierenden Zellelemente verschieden. Am empfindlichsten scheinen die Basalzellen der Epidermis, etwas weniger die Zellen der Haarmatrix. Die Polyphenoloxydase der Leukozyten erweist sich als widerstandsfähiger gegenüber Dextrose als die Dopaoxydase.

b) Formalin.

Meerschweinchen 272, dunkelbraune Haut und Haare.

I. Versuchsanordnung.

Es sollte einerseits die Beeinflussung der Reaktion nach Vorbehandlung der Schnitte mit Formollösung, anderseits nach Vorbehandlung lufttrockener aufgezogener Schnitte mit Formoldämpfen studiert werden. Das Vorgehen war folgendes:

1. Es wurden eine Anzahl Schnitte auf den Objektträger aufgezogen und trocknen gelassen. Diese Schnitte wurden dann während 24 Stunden, Schichtseite nach unten, über eine Petri-

schale mit 4 % Formalinlösung gebracht. Das Ganze wurde mit einer Glasschale zugedeckt.

2. Andere Schnitte wurden für 24 Stunden in je eine 1 ‰ und 1 % Formalinlösung gelegt und zugedeckt. Die weitere Behandlung war bei 1 und 2 gleich. Sie bestand in gründlichem Auswaschen in dest. Wasser (die Schnitte färben sich sonst mit Dopa rotbraun) und Verbringen der Schnitte in Dopalösung für 24 Stunden bei Zimmer- und Brutschranktemperatur. Als Kontrollen dienten Nativ- und Unna-Pappenheim-Schnitte, einfache Dopa Zimmer- und Brutschrankpräparate, aufgezogene 24 Stunden luftgetrocknete Schnitte, die dann für weitere 24 Stunden in Dopalösung lagen und endlich Schnitte, die vor der Dopabehandlung für 24 Stunden in dest. Wasser lagen.

II. Schnittbilder.

1. Einfacher Dopa Zimmertemperatur-Schnitt. Das Bindegewebe ist diffus grau. Die Bulbi sind durchwegs kohlschwarz, die Haarschäfte rein gelbbraun gefärbt, wie im Nativschnitt, sie bilden zu den Haarbulbi einen sehr auffallenden Gegensatz. Die Basalschicht der Epidermis gibt eine sehr starke Reaktion. Die Zellen, welche im Nativschnitt Pigmentkörnchen enthalten, sind hier ganz intensiv schwarz gefärbt, wie mit Tuschekörnchen ausgefüllt. Stellenweise finden sich sehr schön ausgebildete Melanoblasten, von dendritischem Bau, mit langen Ausläufern.

2. Formoldampf, 24 Stunden, dann Dopa Zimmertemperatur. Gegenüber dem einfachen Dopaschnitt, der makroskopisch tiefbraun ist, fällt hier die völlige Farblosigkeit auf. Die Reaktion ist gänzlich aufgehoben, sowohl in den Bulbi, die genau gleichen Farbton zeigen wie die Haarschäfte und Bulbi des einfachen Nativschnittes, als auch in der Epidermis, in der sich zahlreiche Melanoblasten, die mit braunem Pigment erfüllt sind, finden, ohne dass sie eine Spur von Reaktion gäben. Auch in den Leukozyten ist die Reaktion fast ganz aufgehoben. Sie zeigen nur eine schwache Braunfärbung.

3. Formoldampf, 24 Stunden, Dopa 37°. Die Bulbi sind etwas dunkler braun als im Nativschnitt. Die Reaktion ist noch angedeutet. In der Epidermis ist sie ganz geschwunden. Die Leukozyten sind dunkler brau und distinkter als bei Zimmertemperatur. Das Ferment ist in ihnen noch etwas besser erhalten als die Dopa-Oxydase in den Epithelzellen.

4. Kontrolle, trocken, 24 Stunden, Dopa-Zimmertemperatur. Die Reaktion in den Bulbi ist noch erhalten, aber gegenüber dem nicht aufgezogenen einfachen Dopaschnitt (1) erheblich abgeschwächt. Gegenüber dem Formoldampfschnitt (2) ist sie intensiver. Das gilt sowohl für Bulbi, als Epithel, als Leukozyten.

5. Kontrolle 24 Stunden in Wasser, dann Dopa-Zimmertemperatur. Die Reaktion ist in allen Teilen deutlich vorhanden, aber schwächer als in 1.

6. Formalin 1 %o, 24 Stunden, dann Dopa-Zimmertemperatur. Die Reaktion ist gegenüber der Kontrolle erheblich abgeschwächt; am wenigsten in den Leukozyten. Die Zellen der Haarmatrix und der Basalschicht sind nur dunkelbraun, nicht mehr tiefschwarz.

7. Formalin 1 %o, 24 Stunden, Dopa 37°. Auch hier ist die gleiche Veränderung deutlich zu konstatieren. Die Leukozyten haben nur sehr sehr wenig gelitten.

8. Formalin 1 %, 24 Stunden, Dopa-Zimmertemperatur. Der Schnitt ist etwas geschrumpft. Die Reaktion in den Bulbi ist sehr deutlich vorhanden, zweifellos viel stärker als bei 1 %o. Die Bulbi sind wieder intensiv braunschwarz, stärker gefärbt als in der Wasserkontrolle. Auch in den Epithelzellen ist die Reaktion sehr deutlich vorhanden. In den Leukozyten ist sie überhaupt nicht abgeschwächt.

9. Formalin 1 %, 24 Stunden, Dopa 37°. Auch hier ist die Reaktion zweifellos viel stärker als bei 1 %o Formalin und zwar gilt dies für Leukozyten, Bulbi und Basalepithelzellen.

III. Versuchsresultat.

Sowohl die Formoldämpfe als die Formollösung schädigen das Dopa-Ferment, teilweise scheinen sie es ganz zu vernichten. Die Leukozyten-Oxydase (Phenolase) ist widerstandsfähiger. Die Schädigung durch Formollösung ist stärker bei niedrigerer als bei hoher Konzentration der Lösung.

c) Phenylhydrazin.

Meerschweinchen 270. Haare hellbraun. Haut dunkelbraun.

I. Versuchsanordnung.

Es wurde eine 1 %o wässerige Lösung von Phenylhydrazin hydrochloricum angewandt, in der die Schnitte während 24 Stun-

den liegen blieben; dann wurden sie in Wasser ausgewaschen und weiter verarbeitet. Als Kontrollen dienten: einfache Nativ und Dopaschnitte, sowie Schnitte, die vor dem Verbringen in Dopalösung 24 Stunden im Wasser gelegen hatten.

II. Schnittbilder.

1. Dopa-Zimmertemperatur. Schnitt dunkelbraun, Bulbi dunkelgraubraun bis braunschwarz, stark reagierend. Die Leukozyten sind intensiv gefärbt und erscheinen als braunschwarze Klumpen.

2. Phenylhydrazin, Dopa-Zimmertemperatur. Die Reaktion ist in allen Teilen vollständig negativ. Die einzige Färbung im Schnitt rührt von dem braunen nativen Pigment her. Auch das Bindegewebe ist ganz hell. Die Leukozyten sind überhaupt nicht sichtbar.

3. Wasserkontrolle, Dopa-Zimmertemperatur. Die Reaktion ist sehr stark abgeschwächt. Die Bulbi sind nicht mehr braunschwarz, sondern nur ganz leicht braun. Die Basalschicht zeigt ebenfalls noch schwach positive Reaktion. Die dendritischen pigmentierten Zellen der Basalschicht zeigen nur eine leichte, diffuse rauchgraue, bis graubraune Färbung als Reaktion. Die Leukozyten weisen ebenfalls schwache Reaktion auf und besitzen an manchen Stellen nur noch geringe Braunfärbung. An andern Stellen ist die Reaktion wieder etwas stärker.

III. Versuchsresultat.

Durch Phenylhydrazin wird die Dopaoxydase sowohl in den Bulbi als im Basal-Epithel ebenso wie die Polyphenolase in den Leukozyten vollständig vernichtet. Die Wasserkontrolle zeigt wiederum die starke Schädigung durch einfaches dest. Wasser.

d) Natrium bisulfurosum.

Meerschweinchen 120. Haut leicht gelblich. Haare gelbbraun.

I. Versuchsanordnung.

Die Schnitte werden für 24 Stunden in eine 1 ‰ und in eine $^1/_{10}$ ‰ wässerige Lösung von Natriumbisulfurosum gebracht, dann ausgewaschen und der Einwirkung von Dopa überlassen, Weiterbehandlung Alkohol, Xylol, Einbettung. Als Kontrolle dienten Nativ- und Unna-Pappenheimschnitt und ein paar Dopaschnitte.

II. Schnittbilder.

1. Dopa racemisch. Die Reaktion ist positiv. Die Bulbi besitzen eine schwarzbraune bis graubraune Farbe. Sehr intensiv ist die Reaktion der Basalzellen. Sie sind teils in toto in schwarzbraune Massen verwandelt, teils diffus oder granulär dunkelbraun gefärbt, ebenso stark reagieren die Leukozyten.

2. Natrium Bisulfurosum 1 : 10,000, dann Dopa 37°. Die Reaktion der Bulbi ist fast ganz aufgehoben, in den Leukozyten höchstens etwas abgeschwächt.

3. Natrium Bisulfurosum 1 : 1000, dann Dopa 37°. Makroskopisch erscheint der Schnitt ganz hell. Die Reaktion in den Bulbi gleich 0, in den Leukozyten stark abgeschwächt.

III. Versuchsresultat.

Natrium Bisulfurosum hat eine starke Schädigung des Fermentes im Gefolge, die mit steigender Verdünnung abnimmt.

e) Natriumhydrosulfit.

I. Versuchanordnung.

Verwendet wird ein Hautstückchen von Meerschweinchen 269, Haut und Haare dunkelbraun.

Die Schnitte werden in üblicher Weise hergestellt. Als Kontrollen dienen einfache Nativ-, Unna-Pappenheim- und Dopa-Schnitte. Die Vorbehandlung der eigentlichen Versuchsschnitte geschieht so, dass diese für 24 Stunden in eine 1 ‰ Natrium-Hydrosulfitlösung gebracht werden, dann werden sie in dest. Wasser ausgewaschen und weiterverarbeitet.

II. Schnittbilder.

Um eine Wiederholung zu vermeiden, verweise ich für die Kontrollschnitte auf den Dextroseversuch, da er zu gleicher Zeit und mit dem gleichen Tier angestellt wurde.

1. Natriumhydrosulfit 1 ‰, 24 Stunden, dann Dopa-Zimmertemperatur. Schon makraskopisch ist der Schnitt hell und farblos, ganz dem Nativschnitt gleichend. Die Reaktion erweist sich mikroskopisch als gleich 0. Das native Pigment im Haarschaft, Bulbus und Epidermis ist erhalten. Die Leukozyten zeigen keinerlei Reaktion und sind nicht erkennbar.

2. Natriumhydrosulfit, 24 Stunden, dann Dopa 37°. Makroskopisch ist der Schnitt etwas dunkler als der vorherge-

hende. Mikroskopisch erweisen sich einzelne Bulbi etwas dunkler braun als im Nativschnitt. Das Basalepithel besitzt nur unverändertes natives Pigment. Die Leukozyten reagieren positiv, jedoch sehr schwach, sie sind blassgrau bis grauschwarz.

III. Versuchsresultat.

Die Dopaoxydase wird durch Natriumhydrosulfit stark geschädigt oder völlig vernichtet. Die Phenolase der Leukozyten wird ebenfalls so stark geschädigt, dass nur noch bei der Temperatur von 37° eine geringe Reaktion erkennbar ist.

4. Toluol.

Meerschweinchen 269. Haut und Haare dunkelbraun.

I. Versuchsanordnung.

Zur Prüfung der Reaktion bei Behandlung der Schnitte mit Toluol ging ich folgendermassen vor. Ich nahm eine gewöhnliche 1 ‰ Dopalösung und liess in je 3 cm^3 davon 2 Tropfen Toluol purissimum fallen. Das Ganze wurde gut gemischt, die Schnitte hineingelegt und 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Als Kontrollen dienten einfache Nativschnitte, Unna-Pappenheim und einfache Dopaschnitte, ohne Toluolzusatz.

II. Schnittbilder.

1. Dopa-Zimmertemperatur. Die Bulbi reagieren sehr stark positiv. Sie sind braun bis braunschwarz. Die Basalzellschicht erscheint als ein teils kontinuierlich angeordnetes diffus schwarzes Band, teils pallisadenartig. Teilweise sind auch einzelne deutlich dendritische Zellen erkennbar, die eine mehr oder minder stark braune Färbung aufweisen.

2. Toluol-Dopa-Zimmertemperatur. Die Reaktion ist stark abgeschwächt, fast gleich 0. Es ist nur noch eine leichte diffuse Graufärbung der Bulbi und der Basalzellen vorhanden. Leukozyten: Die Reaktion hat wenig gelitten, auch hier ist aber eine geringe Abschwächung erkennbar.

III. Versuchsresultat.

Toluol schädigt das Ferment in Bulbus und Epithel dermassen, dass die Schädigung einer Vernichtung gleichkommt. Das Leukozytenferment dagegen scheint gegenüber Toluol bedeutend widerstandsfähiger zu sein, erleidet aber auch eine gewisse Einbusse seiner spezifischen Wirkungskraft.

5. Alkaloide.

a) Cocain hydrochloricum.

Meerschweinchen 204. Haut und Haare braun.

I. Versuchsanordnung.

Die Schnitte werden für 24 Stunden teils in eine 1 %, teils in eine 1 ‰ Lösung von Cocain Hydrochloricum gelegt, dann ausgewaschen und weiter verarbeitet. Kontrollen Nativ, Unna-Pappenheim und einfache Dopaschnitte, sowie eine Wasserkontrolle.

II. Schnittbilder.

Über das Aussehen der Kontrollen vergl. sub. 2) Säuren und Laugen.

1. Cocain 1 %. dann Dopa-Zimmertemperatur. Es ist noch eine deutlich positive Reaktion der Bulbi vorhanden, die jedoch gegenüber den einfachen Dopapräparaten deutlich abgeschwächt ist. Statt intensiv schwarzbraun, sind die Haar-Matrixzellen mehr oder weniger dunkelgraubraun. Auch die Basalzellen zeigen eine deutliche Abschwächung, doch ist auch in ihnen die Reaktion noch erkennbar. In den Leukozyten ist die Reaktion ebenfalls positiv, aber deutlich abgeschwächt.

2. Cocain 1 %, dann Dopa 37°. Das Bindegewebe ist ganz auffallend stark dunkelbraun gefärbt, viel intensiver als im einfachen Dopaschnitt. Die Bindegewebsbündel erscheinen viel dichter und sehen wie kontrahiert aus. In den Bulbi ist die Reaktion gegenüber der einfachen Dopakontrolle sehr deutlich und ganz erheblich abgeschwächt. Sie sind nicht schwarz, sondern mehr oder weniger dunkelbraun. Die Abschwächung ist relativ stärker als in 1; in manchen Bulbi erscheint die Reaktion ganz aufgehoben. Die Leukozyten besitzen eine positive, nur wenig abgeschwächte Reaktion.

3. Cocain 1 ‰, Dopa-Zimmertemperatur. Die Bulbi reagieren ebenso stark wie in der einfachen Dopakontrolle, ebenso das Stratum germinativum. In den Leukozyten ist die Reaktion positiv, stellenweise vielleicht etwas abgeschwächt.

4. Cocain 1 ‰, Dopa 37°. In den Bulbi ist die Reaktion jedenfalls etwas abgeschwächt, während sie in den Leukozyten nahezu ganz normal ist.

b) Morphinum hydrochloricum.

Meerschweinchen 120. Haut hellgelb, Haare braun.

I. Versuchsanordnung.

Die in üblicher Weise hergestellten Schnitte werden 24 Stunden in 1 % Morphiumlösung gelegt, ausgewaschen und mit racemischer Dopalösung bei 37° behandelt. Kontrollen: Einfaches Dopapräparat, Brutschrank- und Nativ- und Unna-Pappenheim-Schnitt.

II. Schnittbilder.

Was die Kontrollen anbetrifft, so verweise ich auf den Versuch mit Natrium bisulfurosum (3 d).

1. Morphin 1 %, Dopa racemisch 37°. Die Reaktion ist in allen Teilen deutlich abgeschwächt.

III. Versuchsresultat der Alkaloidversuche.

Die Alkaloide üben unverkennbar einen schädigenden Einfluss, auch schon in stark verdünnter Lösung, auf die Dopa-Oxydase aus, jedoch ist die Schädigung eine nur geringgradige.

6. Cyanwasserstoff.

Meerschweinchen 207. Haut und Haare gelb.

a) Gasförmiger Cyanwasserstoff.

I. Versuchsanordnung.

Um die Wirkung gasförmigen Cyanwasserstoffs zu studieren, wurden die Schnitte aufgezogen und während 1, resp. 12, resp. 24 Stunden, Schichtseite nach unten, über eine Schale gelegt, die eine wässerige Lösung von Cyanwasserstoff enthielt. Die Blausäure wurde dadurch hergestellt, dass $^1/_{10}$ N KCN Lösung mit $^1/_{10}$ N HCl Lösung bis zur schwachsauren Reaktion versetzt wurde. Als Kontrollen dienten aufgezogene Schnitte, die während der gleichen Zeit (1, 12 und 24 Stunden) an der Luft bei Zimmertemperatur gelegen hatten, dann während 24 Stunden in Dopalösung gelegt wurden.

II. Schnittbilder.

1. Schnitte 1 Stunde über gasförmigem Cyanwasserstoff, dann Dopa-Zimmertemperatur. a) Kontrollschnitt:

Die Reakt. ist gegenüber dem gewöhnlichen Dopapräparat stark abgeschwächt. Die Bulbi sind nur dunkelbraun.

b) Cyanwasserstoffschnitt: Die Reaktion ist noch viel geringer als in der Kontrolle. Die Leukozyten reagieren normal.

2. Schnitte 1 Stunde über gasförmigem Cyanwasserstoff, dann Dopa-37°. Die Resultate sind im Kontrollschnitt und im Versuchsschnitt ganz entsprechend den sub 1 beschriebenen.

3. Schnitte 12 Stunden über gasförmigem Cyanwasserstoff, dann 24 Stunden in Dopalösung bei Zimmertemperatur und bei 37°. Die Kontrollen besitzen noch positive, wenn auch stark abgeschwächte Reaktion.

Die vorbehandelten Versuchsschnitte geben die spezielle Dopareaktion nicht mehr, doch sind die Leukozyten noch schwach positiv.

4. Schnitte 24 Stunden über gasförmigem Cyanwasserstoff, dann 24 Stunden in Dopalösung bei Zimmertemperatur und bei 37°. Die Kontrollen besitzen in allen in Betracht kommenden Teilen noch sehr schwach positive Reaktion.

Die Versuchsschnitte geben keine Reaktion mehr; auch die Leukozyten reagieren nicht.

b) Gelöster Cyanwasserstoff.

I. Versuchsanordnung.

Die Schnitte wurden 1 Stunde in die oben angegebene, wässerige Lösung von Cyanwasserstoff gelegt, dann in der üblichen Weise weiter behandelt. Als Kontrollen dienten Schnitte, die vor dem Aufenthalt in Dopalösung 1 Stunde in aqua dest. gelegen hatten.

II. Schnittbilder.

1. Bei Nachbehandlung in Dopalösung bei Zimmertemperatur. Die Reaktion erweist sich als durchwegs vollständig negativ. Der ganze Schnitt ist in toto heller als der entsprechende, in Wasser eingetauchte Kontrollschnitt.

2. Bei Nachbehandlung in Dopalösung bei 37°. Der Kontrollschnitt, der vor der Dopabehandlung 1 Stunde in Wasser lag, ist schon makroskopisch ziemlich dunkelbraun, während der Cyanwasserstoff-Versuchsschnitt völlig hell und farblos ist.

Die Leukozyten besitzen ebenfalls keine positive Reaktion. Der ganze Schnitt ist ziemlich stark mitgenommen.

III. Versuchsresultat der Cyanwasserstoffversuche a) und b).

Cyanwasserstoff schädigt die Dopaoxydase stark. Die Schädigung ist am grössten, wenn die Schnitte direkt in eine Cyanwasserstofflösung (b) gebracht werden, am geringsten bei kurzer Einwirkung des gasförmigen HCN. Bei lange dauernder Einwirkung scheint eine völlige Vernichtung der Dopaoxydase die Folge zu sein.

Die Phenolase der Leukozyten scheint etwas widerstandsfähiger zu sein.

7. Ausfall der Reaktion bei Abwesenheit von freiem Sauerstoff.

Meerschweinchen 285, Haut und Haare braun.

I. Versuchsanordnung.

Das Gefäss, in welches die Schnitte kamen, wurde folgendermassen von Sauerstoff befreit: Ein eiserner Kessel mit aufgeschliffenem Deckel wurde luftleer gepumpt und dann zugleich mit Wasserstoff gefüllt. Um etwa noch vorhandenen, freien Sauerstoff zu binden, war vorher auf den Boden des Gefässes Kalilauge und Pyrogallol in Substanz gebracht und sofort nach der Leerpumpung mit Wasser übergossen worden (Methode Massini in: Über anaerobe Bakterien, Zeitschr. f. d. ges. experim. Medizin. Band II. Heft 3. 1913). In diesen Kessel wurden die Schnitte, die in Dopalösung lagen, für 24 Stunden gestellt. Kontrollen: Schnitte, die 24 Stunden in Na Cl Lösung im O freien Raum lagen. Nachdem die Schnitte 24 Stunden im Vacuum bei Zimmertemperatur lagen, wird der Kessel eröffnet und die Schnitte teils sofort in Glyzerin eingebettet und betrachtet, teils zuerst in von Kohlensäure durchströmtem Wasser ausgewaschen und in üblicher Weise in Kanadabalsam eingebettet.

II. Schnittbilder.

a) Schnitte, die 24 Stunden im O-Vacuum lagen, dann sofort in Neutralglyzerin eingebettet wurden. Sie zeigen sofort nach der Einbettung keine Reaktion. Die pigmentführende Basalzellschicht der Epidermis ist höchstens um

eine Nüance dunkler als in der Na Cl Kontrolle. In den Haarbulbi ist keine Reaktion erkennbar.

Die Leukozyten der Cutis sind beim Herausnehmen farblos. Nach 5—10 Minuten treten sie als blassgraue Punkte aus der Umgebung hervor, während sie in der Kontrolle unsichtbar bleiben. Wiederholte Inspektion des Präparates nach 3,6 und 24 Stunden lässt keine weitere Veränderung erkennen.

b) Schnitte, die aus dem Vaccuum in kohlensäuredurchströmtes Wasser gelegt und dann eingebettet wurden. Die Schnitte lassen, auch bei wiederholter Betrachtung keinerlei Reaktion erkennen, sie verändern sich nicht.

III. Versuchsresultat.

Abwesenheit von Sauerstoff verhindert den normalen Ablauf der spezifischen Fermentreaktion, sowohl der Dopaoxydase als der Phenolase. Der Versuch legt auch den Schluss nahe, dass der Reagens nicht zuerst gebunden wird, um dann in einem zweiten Zeitraum die Reaktion zuzulassen, denn sonst wäre zu erwarten, dass sekundär, nach Entfernung der Schnitte aus dem O-freien Raum eine Dunkelfärbung der fermentführenden Zellelemente aufträte.

B. Beeinflussungen physikalischer Natur.

1. Temperaturversuch.

Meerschweinchen 204, Haut und Haare braun.

I. Versuchsanordnung.

Als Versuchstemperaturen werden gewählt 37°, 57°, 70° und 90°. Vier Stunden bevor die Gefrierschnitte angefertigt werden, werden vier Schränke auf diese Temperaturen gebracht und eingestellt. In den Schränken stehen die Wassergefässe, die bestimmt sind, die Schnitte aufzunehmen. Als Kontrolle wird auch ein Zimmertemperaturversuch angestellt. Die Temperatur betrug 15,5°. Sofort nach Fertigstellung wurden die Schnitte in die erwärmten Flüssigkeiten gebracht; bei 15,5°, 37°, 57° und 70° verblieben sie eine Stunde, bei 90° nur 1 Minute. Sofort nach Ablauf der Exponierungszeit wurden die Schnitte durch Zugiessen von geeistem Wasser auf Zimmertemperatur gebracht und der Einwirkung der Dopalösung überlassen.

Kontrolle: Nativ-, Unna-Pappenheim und gewöhnliche Dopakontrolle.

II. Schnittbilder.

1. Schnitte, 1 Min. 90°, dann Dopa-Zimmertemperatur. Der Schnitt ist gegenüber der einfachen Dopa-Zimmertemperaturkontrolle stark geschrumpft, und entschieden heller.

Mikroskopisch ist jede Spur einer Reaktion, sowohl in den Leukozyten, als in den Bulbi, als in den Basalzellen der Epidermis, verschwunden. Dort, wo das Bindegewebe stark geschrumpft ist, zeigt es ziemlich starke Dunkelfärbung.

2. Schnitte 1 Min. bei 90°, dann Dopa 37°. Die diffuse Färbung des Schnittes ist bedeutend dunkler. Die Reaktion ist ebenfalls gänzlich aufgehoben.

3. Schnitte 1 Stunde 70°, dann Dopa-Zimmertemperatur. Die Schnitte sind nur wenig geschrumpft. Makroskopisch ist der Schnitt bedeutend heller als der einfache Dopa-Zimmertemperaturschnitt.

Mikroskopisch: In den Leukozyten ist die Reaktion fast durchwegs ganz geschwunden, nur an einzelnen Stellen sieht man noch einige schwarze Klümpchen. In den Haarbulbi ist die Reaktion vollständig negativ. Auch in der Basalschicht der Epidermis ist keine deutliche Reaktion mehr vorhanden. Das native Pigment ist nirgends zerstört.

4. Schnitte 1 Stunde bei 70°, dann Dopa 37°. Der Schnitt ist stärker geschrumpft als bei Zimmertemperatur. Makroskopisch zeigt der Schnitt ebenso starke diffuse schwarzbraune Färbung wie der einfache Dopa-37° Schnitt. Mikroskopisch: Die Leukozyten sind an einzelnen Stellen positiv reagierend. Sie imponieren als schwarzgraue bis schwarzbraune undurchsichtige Klümpchen. Die Bulbi besitzen keine eigentlich positive Reaktion mehr. Das ganze Bild ist aber infolge einer sehr verwaschenen Zeichnung und stellenweise zu starker Dunkelfärbung, so dass die Gewebszellen nicht mehr gut unterschieden werden können, nicht klar zu deuten. Einzelne Bulbi zeigen vielleicht eine diffuse Braunfärbung.

5. Schnitte 1 Stunde bei 57°, dann 24 Stunden Dopa-Zimmertemperatur. Makroskopisch erscheint der Schnitt etwas heller als der einfache Dopa-Zimmerschnitt. Mikroskopisch: Bulbi reagieren negativ, höchstens hie und da findet sich ein etwas dunkler brauner Bulbus. Die Basalschicht der Epidermis besitzt ebenfalls völlig negative Reak-

tion. Die Leukozyten weisen eine positive, aber stark abgeschwächte Reaktion auf.

6. Schnitte 1 Stunde 57°, dann Dopa 37°. Die Reaktion ist in einigen Bulbi vorhanden aber sehr stark abgeschwächt. Sie zeigt sich durch eine nur noch unerhebliche Braunfärbung an. Die Leukozyten besitzen gruppenweise ebenfalls noch positive Reaktion.

7. Schnitte 1 Stunde 37°, dann Dopa-Zimmertemperatur. Die Schnitte scheinen in keiner Weise geschädigt zu sein. Die Reaktion ist genau so stark wie im gewöhnlichen Dopapräparat. Bulbi und Bulbushals besitzen kohlschwarze Farbe. Die Basalschicht der Epidermis weist eine sehr schöne und deutliche Reaktion auf in Form eines stellenweise kontinuierlichen, stellenweise öfters unterbrochenen, rein schwarzen Basalstreifens, der sich bei starker Vergrösserung in dendritisch verzweigte Basalzellen (Melanoblasten) auflöst, deren Protoplasma samt Ausläufern mit dunkelschwarzen Granulis vollgepfropft ist. Die Leukozyten haben sehr starke Reaktion, sie imponieren als kohlschwarze, undurchsichtige Klumpen.

8. Schnitte 1 Stunde 37°, dann Dopa 37°. Die Schnitte gleichen ganz den einfachen Brutschrank-Dopa-Kontrollschnitten. Die Bulbi repräsentieren sich als schwarze Keulen, die Basalschicht bildet einen zusammenhängenden undurchsichtigen schwarzen Streifen (die Möglichkeit der Differenzierung einzelner Stellen ist infolge der Dunkelfärbung nicht mehr vorhanden). Die Leukozyten sind kohlschwarz, das Bindegewebe ist tief dunkelbraun gefärbt.

III. Versuchsresultat.

Die Temperatur ist zweifellos von Bedeutung für den Ablauf der Reaktion. Hohe Temperaturen heben die Reaktion vollständig auf, während mittlere Temperaturen nur eine mehr oder weniger starke Schädigung und Abschwächung im Gefolge haben. Temperaturen von 37° scheinen für den Reaktionsablauf ganz ohne Einfluss zu sein. Was die einzelnen in Betracht kommenden Zellelemente anbetrifft, so lässt sich zwischen Bulbuszellen, Basal-Epithel- und Leukozyten kein sicherer Unterschied in der Widerstandskraft konstatieren.

IV.

Zusammenfassung der Resultate.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich in folgenden Sätzen zusammenfassen:

1. Die Dopa-Oxydase der Meerschweinchenhaut ist ein thermolabiles Ferment. Je höher die Temperatur, umso rascher und intensiver die Schädigung der spezifischen Reaktion, die bei 90° ganz aufgehoben wird.

2. Gegenüber Lösungs- und Fällungsmitteln verhält sich das Ferment folgendermassen:

a) Indifferente Lösungsmittel wie destilliertes Wasser und physiologische Kochsalzlösung bewirken eine deutliche Abschwächung des Fermentes. Ob es sich dabei um eine tatsächliche Abschwächung oder, was wahrscheinlicher ist, um eine Auslaugung (Lösung) des Fermentes handelt, bleibt einstweilen unentschieden.

b) Aethylalkohol schwächt die spezifische Reaktion umsomehr ab, je geringer seine Konzentration ist.

c) Fettlösende Mittel (Äther, Azeton, Chloroform) haben nur eine sehr geringe Abschwächung zur Folge. Daraus geht hervor, dass die Ansichten verschiedener Autoren (Kreibich) über die Lipoid-Natur des pigmentbildenden Fermentes nicht zutreffen.

d) Ammonsulfatlösung, sowohl halb wie ganz gesättigt, vernichtet die Wirkung des Fermentes vollkommen, während die Phenolase dadurch nicht aufgehoben wird. Man hat also im Ammonsulfat ein wertvolles Unterscheidungsmittel.

3. Alkalien und Säuren zerstören das Ferment vollständig.

4. Reduzierende Mittel organischer und anorganischer Natur, als da sind: Dextrose, Formalin, Phenylhydrazin, Natriumbisulfurosum und Natrium hydrosulfit, vernichten das Ferment schon in geringsten Konzentrationen vollständig.

5. Toluol schwächt die Fermentwirkung stark ab. Versuche, wie die von Durham, welche eine Darstellung des Pigmentfermentes im Hautpressaft unter Zusatz von Toluol behaupten, müssen deshalb von vornherein als verfehlt bezeichnet werden.

6. Alkaloide, von denen Versuche mit Kokain und Morphin angestellt wurden, schwächen die spezifische Reaktion deutlich ab.

7. Cyanwasserstoff vernichtet, entsprechend dem allgemeinen Fermentgesetze, die Wirkung fast sofort.

8. Ablauf der Reaktion bei Abwesenheit von freiem Sauerstoff: Durch den Vacuumversuch lässt sich beweisen, dass das Ferment im Sauerstoff freien Raum nicht zur Wirksamkeit kommt. Die Reaktion tritt nicht auf.

Literatur.

1. Schultze: Weitere Mitteilungen über Oxydase-Reaktionen an Gewebsschnitten (Münchner Med. Wochenschr. 1910, pag. 2171 u. ff.).

2. Batelli und Stern: Die Oxydationsfermente (in Asher-Spiro, Ergebnisse der Physiologie 1912).

3. Bloch Br. und Ryhiner, P.: Histochemische Untersuchungen an überlebendem Gewebe über fermentative Oxydation und Pigmentbildung (Zeitschrift f. d. ges. experim. Medizin 1916).

4. Bloch, Br. Das Problem der Pigmentbildung (Arch. für Dermat. u. Syphilis 1917).